

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591978

研究課題名（和文） 機能的層構造を有する小児の気管再生法に関する研究

研究課題名（英文） Research on regenerative medicine of pediatric airways with functional laminar structure.

研究代表者

神山 雅史 (KAMIYAMA MASAFUMI)

近畿大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20403074

研究成果の概要（和文）：本研究では、家兎の耳介軟骨より作製した軟骨シートを用い、これを我々が開発したin vitroにおける回転培養法にて足場を用いない円筒状構造物として再生させた上で、さらに繊維芽細胞層、円柱繊毛上皮層という機能の異なる層構造を有する細胞シートを作製した。この細胞シート群を、種類の異なる細胞を層状に培養する目的で開発された細胞積層化技術を応用して、外層に繊維芽細胞層、中層に軟骨細胞層、内層に円柱繊毛上皮層を積層化し、回転培養法で円筒状の機能的構造体とすることを試みたが現時点では困難であった。本法によって機能的層構造を有した気管の再生が可能となれば、小児のように広範囲の気管を再生気管によって置換する治療法への道が開かれると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Auricular chondrocytes were harvested from rabbits and cultivated to form a chondrocyte sheet. We manufactured cylindrical cartilage structure from the sheet by the in vitro roller tube culture. Furthermore, we made the fibroblast layer sheet and column cilia epithelial layer sheet with the different function that varied in each. We tried laminating these three kinds of seats (We placed column cilia epithelial layers, a cartilage cell layer and the fibroblast layer sequentially from the inside), and tried to manufacture cylindrical functional structure, however resulted in failure of regeneration. If tracheal regeneration having functional laminar structure is enabled by this method, a new therapy for pediatric airway disease will be developed using the regeneration trachea.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

 キーワード：(1) 再生医療、(2) 機能的層構造、(3) 気管軟骨、(4) 細胞積層化、
(5) 細胞シート工学、(6) Tissue engineering、(7) Cylindrical cartilage

1. 研究開始当初の背景

近年、成人呼吸器外科領域では再生気管が臨床応用されはじめている (Omori K, et al. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 114:429-433, 2005)。これらの再生気管は悪性腫瘍の治療のために部分切除を余儀なくされた気管や気管支の代用として用いられるためのもので、骨格強度を保持するために非分解性素材を用い、これを足場として周囲からの結合組織の浸潤や気管粘膜上皮の再生を促すことによって再生される。成人では再生気管は成長する必要がないため非分解性素材が足場のまま残存しても問題なく、また置換範囲が小さいため気道の主たる機能層である気管粘膜上皮は周囲からの浸潤によっても十分再生される。これに対して小児呼吸器外科領域において再生気管が必要と考えられる疾患では、重症の気管・気管支軟化症や広範囲型先天性気管狭窄症、気管無形成など置換を要する気管が広範囲に亘るものが多い。そのため再生された気管には 1) 骨格となる軟骨組織が十分な強度を有すること、2) 成長に備えて足場として非分解性素材を含まないこと、3) 軟骨組織だけでなく気道における主たる機能層である気管粘膜上皮の再生も同時に行うこと、などが要求される。しかし、生体分解性素材の足場を用いたこれまでの気管再生の研究では、足場周囲に炎症反応を来したり (Rotter N, et al. *Tissue Eng* 11:192-200, 2005)、足場周囲の軟骨細胞が壊死したりするため (Wang X, et al. *Biomaterials* 25:3681-3688, 2004) 軟骨組織が退縮することが知られ臨床応用には至っておらず、足場そのものを必要としない気管の再生方法の新たな開発が望まれている。

近年では足場を必要としない組織再生の方法として、細胞シート工学の応用による心筋組織の再生がすでに臨床応用されているが、軟骨再生の領域においても足場を必要としない再生法の研究が報告されるようになってきた (Weidenbecher M, et al, *Laryngoscope* 118:593-598, 2008)。このような発想に基づき、研究分担者 (谷) らは *in vitro* で作成した軟骨細胞膜シートを、*in vitro* における回転培養法を用いて円筒状の軟骨構造体として再生する方法を開発した。一方、再生気管においては、感染防御機構として外来異物を排除するという機能を有する円柱絨毛上皮で内腔が覆われていることが必須である。広範囲の気道の内腔に気管粘膜上皮を再生する方法はこれまで開発されていなかったが、最近、やはり細胞シート工学の手法を応用して予め血管新生を促した人工気管の内腔に円柱絨毛上皮である気管粘膜上皮を再生させる方法が報告され (Kanzaki M, *Tissue Engineer* 12:1275-1283,

2006)、注目を浴びている。

このように、足場として非分解性素材を用いず軟骨による気管の骨格を再生したり、内腔に気道の機能層である気管粘膜上皮を再生する方法として、細胞膜シートを用いた培養法は応用範囲が広く有望と考えられるが、これまで国内外で報告されてきた研究においては、単一種の細胞集団を細胞膜シートとして再生に用いるものであって、本研究が目指しているように細胞積層化技術を応用して機能の異なった自己の細胞集団を、初期の段階から多層構造の細胞膜シートとして培養した上で、組織や器官の再生を行おうとする研究は、全く新しい発想に基づくものである。

2. 研究の目的

そこで本研究では、以下のような3つの目的を設定した。

目的1: 機能的構造を有する細胞シート(線維芽細胞、軟骨細胞、絨毛上皮細胞)の作製

目的2: 機能的三層構造を持った細胞シートの作製および円筒状構造体の回転培養

目的3: 機能的層構造を持つ円筒状構造体の自家移植

3. 研究の方法

実験1: 実験動物には雌性成体家兎 (New Zealand White Rabbit) を用いる。全身麻酔下に家兎の耳介を無菌的に摘出したうえ、耳介軟骨と皮下組織に分離する。耳介軟骨はII型コラゲナーゼを用いて融解して軟骨細胞を遊離する (Fuchs JR, *J Pediatric Surg*, 37:1720-1725, 2002)。また皮下組織より線維芽細胞を遊離して採取する。同時に鼻粘膜を部分切除し、細切して円柱絨毛上皮を遊離して採取する。それぞれの適合培養液中でCO₂ インキュベーターを用いて、37°C、5%CO₂の条件下で培養して継体し細胞数を増加させる。

一定の細胞数の浮遊液としたのち、これらの三種類の細胞を用いて層構造の細胞シートを作製する。まず培養シャーレ上に線維芽細胞を1×10⁵/cm³の濃度で播種して24時間静置して単層培養を行う。ECM フィルム (CellFeuille®: 住友ベークライト社製、Matsusaki M, et al, *Angew Chem Int Ed* 46:4689-4691, 2007) を添加して接着処理を行ったのち、1継体培養した軟骨細胞を多層になるように2×10⁶/cm³の高密度で播種して培養する。さらに24時間静置して培養を行ったのち、同様にECM フィルムを添加して接着処理を行い、その上に円柱絨毛上皮を1×10⁵/cm³の濃度で播種して単層培養を行う。この三層構造の細胞シートをさらに37°C、5%

CO₂の条件下で3日、7日、10日、14日間継続して培養する。作製された細胞シートはHE染色を行って組織学的評価を行う。軟骨細胞層および円柱繊毛上皮層の分化の程度とともに、シャーレから剥離した時の細胞シートの強度を評価し、最も適切な培養期間を策定する。

追加実験：軟骨組織は極めて低酸素濃度環境下（軟骨組織表層 O₂: ~6%, 深層 O₂: ~1%）にあり、軟骨細胞は低酸素状態に適応している。In vitro において、低酸素分圧下で軟骨細胞増殖能やマトリックス合成能などの軟骨細胞活性は亢進することがよく知られている。以上より、低酸素環境下での軟骨シート細胞の変化の検討を加えた。前述の O₂ 21% の通常の条件での培養に加え、O₂ 5% の条件での培養を施行し、軟骨シートの強度等の差異の評価を行った。さらにこの軟骨シートを研究分担者（谷）が用いた方法と同様にシャーレから剥離してシリコンチューブに巻き付け、回転培養器に入れて O₂ 5% の条件での培養を施行し、回転培養を継続する。得られた円筒状構造体について、O₂ 21% の通常の条件での回転培養で得られた円筒状構造体との強度の比較も行った。

実験 2：実験 1 で得られた細胞シートは、研究分担者（谷）が用いた方法と同様にシャーレから剥離してシリコンチューブに巻き付け、回転培養器に入れてそれぞれ 1 週間、2 週間、4 週間、6 週間、回転培養を継続する。得られた円筒状構造体について、組織学的検討、軟骨基質の含有量の測定、物性強度の測定などを行う。

実験 3：実験 2 で作製した円筒状構造体を家兎に自家移植する。移植組織への血流が良好である条件を検討し、自家移植後 2 週、4 週、8 週目に円筒状構造体を摘出し、組織学的検討、軟骨基質の含有量の測定、物性強度の測定などを行う。

4. 研究成果

結果 1：耳介軟骨を II 型コラゲナーゼを用いて融解して軟骨細胞を遊離し、皮下組織より繊維芽細胞を遊離して採取した。同時に鼻粘膜を部分切除し、細切して円柱繊毛上皮を遊離して採取した。これらを CO₂ インキュベーターにて、37°C、5%CO₂ の条件下で培養・継代し細胞数を増加させ、これらの三種類の細胞を用いてそれぞれの細胞シートを作製した。

軟骨細胞は培養によって軟骨基質が増生し、しっかりしたシート状の構造体として形成された。（図 1） 繊維芽細胞も軟骨細胞と比較すると時間を要するもののしっかりしたシート状の構造体として形成された。（図 2）

鼻粘膜の円柱繊毛上皮の培養は鼻粘膜の採取およびその細胞の最適な培養条件の選定に困難を伴ったため、鼻粘膜に代えて家兎の気管粘膜を採取し、この粘膜より繊毛上皮を採取・培養を行った。気管粘膜からは繊毛上皮のシート状の構造体を作製することが可能であった。

次いで、それぞれの構造体をチューブに巻き付けて回転培養を施行し、それぞれの円柱状構造体を作製した。軟骨細胞シートの円柱状構造体（図 1）および繊維芽細胞シートの円柱状構造体（図 2）は、培養を 4 週から 8 週まで継続することにより、シートの厚みも増した。繊毛上皮シートの回転培養では、8 週まで培養を継続したが、単体のシートとしての構造は弱かったが、上記 3 層のシートを積層化して円筒状構造体を作れば、円筒状の構造を維持できる強度を有し、かつ圧迫や屈曲に十分耐えうる柔軟性も持った再生気管として利用できると思われた。

図 1

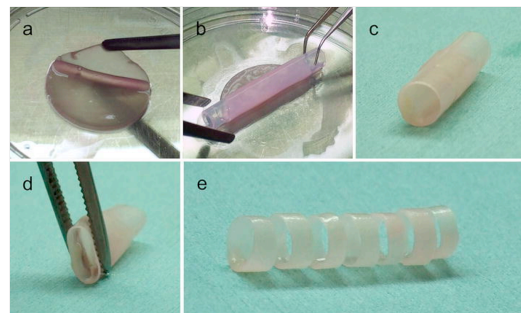
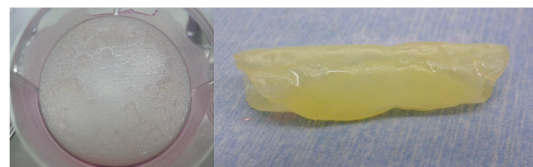


図 2



追加実験の結果

軟骨細胞シートおよび回転培養で得られた円筒状構造体を、O₂ 5% (低酸素) および O₂ 21% の条件で作製した。細胞シート、円筒状構造体ともに、O₂ 5% (低酸素) の条件下のものの方がその強度は強かった。（図 3-1、図 3-2）

図 3-1

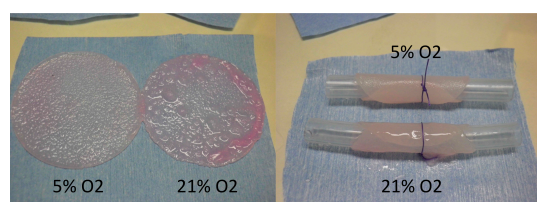
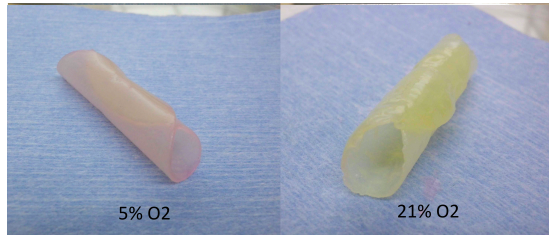
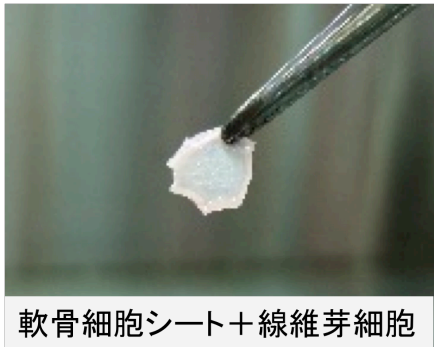


図 3-2



結果 2 : 結果 1 にて各細胞シートの性質を把握した後に 3 種類の細胞 (軟骨細胞、線維芽細胞、絨毛上皮) を用いて層構造 (外層 : 線維芽細胞層、中層 : 軟骨細胞層、内層 : 絨毛上皮層) の細胞シートを ECM フィルムを用いて作製した。実験方法に従いシートの作製を行ったが、細胞シートとしてある程度強度を持った構造体とはなるものの、絨毛上皮層の培養が進まず、線維芽細胞層 + 軟骨細胞層のみのシートとなった。(図 4) 各層の接着条件や培養条件を変更しながら、ECM フィルムを用いたシート作製を行ったが、上記のように 3 層構造を持った細胞シートの作製は困難であった。

図 4



結果 3 : 3 層の円筒状構造体の作製が困難であったため、この構造対の家兎への自家移植および移植後の構造体の評価はできなかった。

【考察】

本研究では、目標とした 3 層構造の細胞シートの作製が困難であり、このシートを用いた円筒状構造体としての気管再生には至らなかった。ただし、各シートでの円筒構造体の作製は可能であり、3 層構造の細胞シートの作製技術が確立できれば、目標とする層構造をもった気管再生が可能になると考えられた。また、軟骨細胞シートおよびその円筒状構造体の作製には低酸素の条件の方が好都合であることが判明した。今後、3 層構造の細胞シートの作製方法とし

て、ECM フィルムを用いる以外の方法も検討する必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 3 件)

① Tani G, Usui N, kamiyama M, Oue T, Fukuzawa M. In vitro construction of scaffold-free cylindrical cartilage using cell sheet-based tissue engineering. *Pediatr Surg Int* 26: 179-185, 2010 (査読有)

② 谷 岳人、臼井規朗、神山雅史、福澤正洋. 小児外科における再生医療—足場を用いない気管軟骨再生の試みと境界領域としての臓器再生医療— *日本周産期・新生児医学会雑誌* 46: 993-996, 2010 (査読なし)

③ Kamiyama M, Usui N, Tani G, Nose K, Kimura T, Fukuzawa M. Airway deformation in patients demonstrating pectus excavatum with an improvement after the Nuss procedure. *Pediatr Surg Int* 27: 61-66, 2011(査読有)

〔学会発表〕 (計 3 件)

① Tani G, Usui N, kamiyama M, Fukuzawa M. Tissue engineering of tracheal cartilage: scaffold free cartilaginous constructs using cell sheet-based tissue engineering. 106th Annual Meeting of the German Society of Paediatric and Adolescent Medicine Potsdam, Germany, 9.16-19, 2010

② 谷 岳人、臼井規朗、神山雅史、福澤正洋. 小児外科における再生医療—足場を用いない気管軟骨再生の試みと境界領域としての臓器再生医療— 第46回日本周産期・新生児医学会学術集会 神戸 7.11-13, 2010

③ 谷 岳人、臼井規朗、神山雅史、福澤正洋. 軟骨細胞シートを応用した気管軟骨再生法の開発 第110回日本外科学会定期学術集会 名古屋 4.8-10, 2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神山 雅史 (KAMIYAMA MASAFUMI)

近畿大学・医学部附属病院・講師

研究者番号 : 20403074

(2)研究分担者

臼井 規朗 (USUI NORIAKI)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：30273626

(H23年まで研究分担者として参画)

谷 岳人 (TANI GAKUTO)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60467561

(H22年まで研究分担者として参画)

(3)連携研究者

なし